

На правах рукописи

ФОМИНА МАРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ
В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Рязань – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Терентьев Александр Александрович**

Официальные оппоненты:

Камилов Феликс Хусаинович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологической химии

Ланкин Вадим Зиновьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник, руководитель отдела биохимии свободнорадикальных процессов

Синицкий Антон Иванович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и.о. заведующего кафедрой биологической химии (биохимии) им. Р.И. Лифшица

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»

Защита диссертации состоится «25» декабря 2018 г. в 11⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Жаднов В.А.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Прогрессивное развитие системы знаний об окислительном стрессе, представляющем собой дисбаланс про- и антиоксидантных реакций (Меньщикова Е.Б., и др, 2008; Halliwell В., 2007), к настоящему моменту сформировало представления о его вовлеченности в патогенез обширного круга заболеваний, а также в целый ряд адаптивных процессов (Ланкин В.З., Тихазе А.К., 2016; Осяева М.К., и др., 2016; Pham-Huy L.A., et al., 2008), что стимулирует дальнейшие исследования, углубляющие понимание механизмов развития окислительного стресса и способов его коррекции. Существенный прогресс в этой области был достигнут исследованиями, продемонстрировавшими вклад в свободнорадикальные процессы активных форм азота (Pacher P., et al., 2007; Szabõ C., 2006), сочетавшимися с описанием антиоксидантных эффектов оксида азота (Hummel S.G., et al., 2006). Кроме того, в настоящее время активно развивается направление исследований, связанное с обнаружением и описанием процесса окислительной модификации белков (ОМБ) (Луцак В.И., 2007; Dalle-Donnea I., et al., 2003), продукты которого рассматриваются современными исследователями не только в качестве наиболее стабильных и удобных для количественного определения показателей выраженности окислительного стресса (Муравлева Л.Е., и др, 2010; Šolak E., 2008), но и как участники физиологических и патологических реакций (Cai Z., et al., 2013; Wall S.B., et al., 2012).

На данный момент известно, что в качестве индукторов окислительной модификации белков способны выступать как активные формы кислорода и азота, так и продукты перекисного окисления липидов, а также металлы переменной валентности и редуцирующие сахара (Baraibar M.A., et al., 2013; Vasil'ev Y.V., et al., 2013), появляются работы, демонстрирующие значение для этого процесса нарушений соотношения про- и антиоксидантных эффектов в условиях истощения антиоксидантной

системы (Иванов В.В., и др., 2011; Raja V., et al., 2010). Также последние годы ознаменованы появлением значительного количества не только экспериментальных, но и клинических исследований, использующих уровень окислительной модификации белков в качестве маркера окислительного стресса (Асташина Н.Б., и др., 2017; Степовая Е.А., и др., 2016; Тихомирова Ю.Р., Конторщикова К.Н., 2015; Garcia-Garcia A., 2012). Тем не менее, исследования в области описания выраженности и характера окислительной модификации белков при адаптивных и патологических процессах, ассоциированных с окислительным стрессом, а также изучения возможностей, способов и механизмов защиты от токсического действия продуктов окислительного повреждения протеинов сохраняют высокую степень актуальности.

В частности, перспективным представляется выяснение антиоксидантных возможностей оксида азота в отношении процесса окислительной модификации белков, поскольку эта часть эффектов, в отличие от прооксидантных (Alvares B., Radi R., 2003; Nakamura T., Lipton S.A., 2016), на данный момент практически не изучена, при том, что наличие других антиоксидантных эффектов этого соединения в настоящее время создало значимое для медицины направление по созданию лекарственных препаратов, способных стабилизировать и транспортировать оксид азота (Ванин А.Ф., 2017; Lewandowska H., et al., 2010).

Важнейшим механизмом защиты от накопления и токсического действия продуктов окислительной модификации белков признана их протеолитическая деградация (Goldberg A.L., 2003). Наиболее изученным механизмом утилизации окисленных протеинов на данный момент является протеасомный протеолиз (Jung T., et al., 2014), однако в последние годы появляются сведения об участии в деградации окислительно поврежденных белков отдельных митохондриальных протеаз (Ngo J.K., et al, 2013), а также лизосомальных катепсинов (Grimm S., et al., 2012); обсуждается возможность

участия в этом процессе шаперон-опосредованной аутофагии (Niforou K., et al., 2014).

Среди известных на данный момент более чем 50 лизосомальных гидролаз особое внимание исследователей привлекает группа лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП, цистеиновые катепсины), особенностью которых является способность к деградации не только внутриклеточных, но и экстрацеллюлярных белков (Turk B., et al., 2000; Turk V., et al., 2012).

Особенности структуры цистеиновых катепсинов, создающие способность к внелизосомальному действию и чувствительность к многочисленным факторам управления активностью (Turk V., et al., 2012), делают их привлекательными кандидатами на роль потенциальных факторов утилизации окислительно модифицированных белков в цитоплазме клетки, что могло бы оказаться существенным дополнением к работе эндосомально-лизосомальной и протеасомной систем деградации поврежденных белков.

В течение многих лет исследования ЛЦП акцентировались в области их экстрацеллюлярных эффектов, что к настоящему времени позволило сформировать представления не только о вовлеченности данной группы ферментов в патогенез целого ряда распространенных и медико-социально значимых заболеваний (Aggarwal N., Sloane B.F., 2014; Pišlar A., Kos J., 2014; Zhao C.F., Herrington D.M., 2016), но и о возможностях фармакологического управления их действием (Vasiljeva O., et al., 2007; Siklos M., et al., 2015).

При сохранении интереса к экстрацеллюлярным эффектам цистеиновых катепсинов, последние годы ознаменовались новым витком исследований, связанных с обнаружением участия лизосомальных протеиназ, в большей степени ЛЦП, в механизмах апоптоза (Repnic U., et al., 2012; Stoka V., et al., 2007), причем не только по классическому, каспазо-зависимому (Cirman T., et al., 2004), но и по отдельному, лизосомально-опосредованному (Sandler M., et al., 2016; Zhu W., et al., 2015) пути. Это, фактически, привело к формированию нового научного направления, разработка которого не только требует дальнейшего уточнения механизмов интра- и внелизосомальной

регуляции активности цистеиновых катепсинов, но и создает необходимость подробного изучения факторов, способных оказывать действие на прижизненную проницаемость (пермеабиллизацию) лизосомальных мембран (ПМЛ), влияя тем самым на выход ферментов в цитоплазму (Boya P., et al., 2003; Serrano-Puebla A., Boya P., 2015).

Поскольку активное изучение механизмов пермеабиллизации лизосомальных мембран началось относительно недавно (Пупышев А.Б., 2011; Repnik U., et al., 2014), процесс находится в настоящее время на этапе активного накопления экспериментальных данных (Fucho R., et al., 2014; Groth-Pedersen L., et al., 2012; Al-Eisawi Z., et al., 2016) и полная систематизированная картина на данный момент не получена. При этом в качестве одного из факторов повышения проницаемости лизосомальной мембраны указывается окислительный стресс (Blomgar R., et al., 2007; Boya P., 2012; Lin Y., et al., 2010), однако исследования механизмов связи этих процессов весьма немногочисленны (Terman A., et al., 2006). Тем не менее, имеются указания на участие цистеиновых катепсинов в апоптозе, индуцированном активными формами кислорода (АФК) (Ferri K.F., Kroemer G., 2001; Repnik U., et al., 2012; Terman A., Kurz T., 2013), и возможности АФК способствовать ПЛМ через активацию Ca^{2+} -каналов лизосомальной мембраны (Simoza-Toledo A., Penner R., 2011); также появляются сведения о стабилизации лизосомальной мембраны под действием антиоксидантов (Yan M., et al., 2016; Yang N., et al., 2016; Wang X., et al., 2012), хотя результаты исследований пока весьма фрагментарны.

Таким образом, исследование взаимосвязей изменений активности цистеиновых катепсинов и проницаемости лизосомальной мембраны с уровнем окислительной модификации белка при состояниях, ассоциированных с окислительным стрессом, а также поиск факторов, способных оказывать корректирующее действие на указанные процессы, представляется актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка направления способна как расширить

понимание механизмов воздействия окислительного повреждения протеинов на активность ферментов и проницаемость мембран и внести вклад в представления о роли лизосомального протеолиза в протеостате, так и послужить основой для дальнейших исследований в области антиоксидантной терапии и фармакологических путей управления апоптозом.

Цель и задачи исследования

Цель: изучить состояние и механизмы изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе и выявить роль функционального состояния цистеиновых протеиназ лизосом различных тканей в процессе адаптации к окислительному повреждению белков.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Разработать способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.
2. Исследовать изменения общей активности лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н на клеточном и тканевом уровне в условиях индукции окислительного стресса.
3. Провести комплексную оценку содержания продуктов окислительной модификации белков различных тканей при воздействии неселективного ингибитора и субстрата NO-синтазы *in vivo*, а также при экспериментальной гипергомоцистеинемии.
4. Исследовать изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, а также оценить состояние проницаемости лизосомальной мембраны в тканях *in vivo* под действием модуляторов синтеза оксида азота и при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

5. Исследовать изменения активности и компарментализации катепсинов В, L, Н, а также оценить состояние проницаемости лизосомальной мембраны в изолированных лизосомах при индукции окислительного стресса *in vitro*.
6. Изучить влияние L-аргинина на показатели окислительной модификации белков, а также установить его возможную роль в качестве фактора, изменяющего активность и компарментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ.
7. Провести анализ связей показателей состояния окислительной модификации белков и изменений активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н.
8. Исследовать возможность разработки способа оценки селективного изменения компарментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые на организменном, тканевом, клеточном и субклеточном уровне продемонстрирована связь изменений активности и компарментализации цистеиновых катепсинов с окислительным стрессом, оцениваемом по выраженности и характеру окислительной модификации белков.

При выполнении исследования разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволивший впервые осуществить полное количественное измерение содержания продуктов спонтанного и металл-катализированного карбонилирования белков с характеристикой соотношения первичных и вторичных маркеров их окислительного повреждения в моделях, сопряженных с окислительным стрессом. Получен патент на изобретение (№2524667 от 27.07.2014). Предложен новый способ количественной оценки избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для индивидуальных представителей группы катепсинов.

Впервые показано, что подавление синтеза оксида азота приводит к нарастанию содержания продуктов окислительной модификации белков в тимоцитах и спленоцитах (*in vitro*) и цитоплазматической фракции ткани печени, почки и легкого (*in vivo*); в *in vivo*- моделях впервые обнаружена обратная зависимость содержания продуктов окислительной модификации белков от концентрации метаболитов оксида азота. Впервые описаны изменения содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки, легкого и миокарда экспериментальной гипергомоцистеинемии.

В *in vitro*- и *in vivo* экспериментах впервые продемонстрирована чувствительность общей активности цистеиновых катепсинов к развитию окислительного стресса, впервые обнаружена прямая зависимость общей активности катепсинов В, L, Н от содержания продуктов окислительного карбонилирования белков.

Впервые описаны зависимости изменений активности и субклеточного распределения лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, а также состояния проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительной модификации белков при *in vivo*- моделировании ситуаций, сопряженных с окислительным стрессом.

Впервые исследовано прямое *in vitro* воздействие индукции окислительного стресса на уровень окислительного карбонилирования белков, активность цистеиновых катепсинов и проницаемость мембраны изолированных лизосом печени крыс с оценкой корректирующего действия L-аргинина.

Обнаружен ранее неизвестный феномен снижения проницаемости лизосомальных мембран при умеренном/кратковременном окислительном стрессе, что позволило впервые сформулировать гипотезу о значении степени повреждения белков лизосомальных мембран в механизме пермеабиллизации.

Получены новые данные об эффектах L-аргинина, не связанных напрямую с участием в генерировании оксида азота: обнаружено, что L-аргинин при изолированном применении способен приводить к уменьшению содержания продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции и лизосомах печени крыс, снижать уровень гомоцистеина в крови при экспериментальной гипергомоцистеинемии, корректировать вызванное индукторами окислительного стресса нарастание содержания окислительно карбонилированных белков, в том числе через влияние на активность и компарментализацию цистеиновых катепсинов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе исследования результаты расширяют фундаментальные представления о механизмах и этапах повреждения белков при окислительном стрессе и способах эндогенной и экзогенной коррекции развивающихся изменений, а также способствуют более глубокому пониманию роли оксида азота в развитии свободнорадикальных патологий.

Обнаруженные корреляции между активностью цистеиновых катепсинов и выраженностью окислительной модификации белков вносят вклад в систему знаний об этой группе ферментов и могут стать основой для дальнейших исследований роли этих компонентов деградиционного пула контроля протеостаза в защите клетки от окислительного повреждения.

Выявление изменений проницаемости лизосомальной мембраны на фоне окислительного повреждения белков является существенным дополнением активно развивающегося направления исследований механизмов пермеабиллизации лизосомальной мембраны и дает возможность определить новые мишени для фармакологического управления ситуациями, сопряженными с апоптозом.

Описанные протективные эффекты L-аргинина дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции состояний, ассоциированных с окислительным стрессом.

Разработанный способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков применим для тканей и биологических жидкостей и его внедрение существенно повышает информативность количественной оценки содержания карбонилированных протеинов, являющихся современным маркером окислительного стресса.

Методология и методы исследования

Исследование носит экспериментальный характер и выполнялось путем *in vitro*- и *in vivo*- моделирования ситуаций, сопряженных с развитием окислительного стресса с последующей оценкой состояния окислительной модификации белков и изменений активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ. Объектом *in vivo*- моделирования являлись конвенциональные половозрелые крысы Wistar, для *in vitro*- исследований использовались клетки, выделенные из крови и тканей указанных лабораторных животных, а также лизосомы печени. Содержание животных, *in vivo*- моделирование, выведение из эксперимента и получение материала для исследований полностью соответствовало требованиям локального этического комитета по проведению научных исследований. Обработка полученных результатов проводилась с использованием прикладных программ. При выполнении работы использовались преимущественно биохимические методы: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, иммунохимические методы, колориметрия; в качестве вспомогательных методов применялись дифференциальное центрифугирование и световая микроскопия; обработка полученных результатов осуществлялась с помощью современных методов статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. *In vitro*- и *in vivo*- исследования демонстрируют наличие чувствительности общей активности цистеиновых катепсинов В, L, Н к действию индукторов окислительного стресса и наличие зависимости ее изменений от выраженности окислительной модификации белков.

2. *In vivo*- подавление синтеза оксида азота приводит к нарастанию содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции гомогенатов паренхиматозных органов в сочетании с множественными изменениями активности и субклеточного распределения цистеиновых катепсинов, коррелирующими со степенью изменений содержания окислительно модифицированных протеинов.
3. Экспериментальная гипергомоцистеинемия ассоциирована с повышением содержания окислительно модифицированных белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки и, в наибольшей степени, в миокарде, но не в ткани легкого; изменения активности и компартментализации цистеиновых катепсинов носят тканеспецифический характер, демонстрируя зависимость от изменений содержания продуктов окислительной модификации белков и, в меньшей степени, от уровня гипергомоцистеинемии.
4. L-аргинин *in vivo* при изолированном и сочетанном с индукторами окислительного стресса применении демонстрирует способность препятствовать накоплению окислительно поврежденных белков, в том числе за счет изменений активности цистеиновых катепсинов во внелизосомальной фракции.
5. Прямое *in vitro*- воздействие индуктора окислительного стресса на изолированные лизосомы печени крыс вызывает нарастание содержания окислительно модифицированных белков и преимущественное повышение активности цистеиновых катепсинов в лизосомальной фракции; изменения существенно корректируются воздействием L-аргинина.
6. На основании комплекса *in vivo*- и *in vitro*- исследований выдвигается предположение о значении степени окислительного повреждения белков лизосомальных мембран для направленности изменений их проницаемости.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов работы подтверждается достаточным количеством наблюдений, адекватностью экспериментальных моделей, применением современных биохимических методов исследования и способов статистической обработки.

Основные результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на: IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения» (Астрахань, 2013); XII региональной научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни лабораторной диагностики южного федерального округа)» (Ростов-на-Дону, 2013); V Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2013); Международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Нижний Новгород, 2014); Межрегиональной научной конференции с международным участием Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2014); 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Абхазия, 2014); XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2015); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии. Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, посвященной 65-летию работы университета на

Рязанской земле (Рязань, 2015); Международной конференции «Новые инновационные технологии в медицине, биологии, фармакологии, экологии»: Весенняя сессия. (Гурзуф, 2015); VII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2015); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева» (Рязань, 2016); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017); 11-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (Астрахань, 2018).

Результаты исследования представлены в 39 публикациях, их них 16 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России (в том числе 7 – в изданиях, цитируемых в системах Scopus и Web of Science), в число публикаций также входит 1 патент на изобретение, 1 методические рекомендации и 1 монография.

Реализация результатов исследования

Результаты исследования внедрены в работу Научно-клинического центра гематологии, онкологии и иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областной клинический кардиологический диспансер», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 11», используются в учебном процессе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени

академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений, списка литературы. Объём работы составляет 280 страниц машинописного текста, содержит 88 рисунков и 34 таблицы. Список литературы включает 438 источников, из них 82 отечественных и 356 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 236 конвенциональных половозрелых крысах Wistar (112 самцов и 124 самки).

В качестве материала для исследования, в зависимости от экспериментальной модели, использовали неседиментируемую (цитоплазматическую) и седиментируемую (лизосомальную) фракции гомогенатов тканей (печень, почка, легкое, миокард) полученные путем дифференциального центрифугирования; гомогенаты стенки тромбированной и интактной вены; суспензии фракционированных лейкоцитов периферической крови (моноядерные – МЯЛ и полиморфноядерные – ПМЯЛ), полученные путем изопикнического центрифугирования; суспензии свежевыделенных тимоцитов и спленоцитов; суспензии лизосом печени, полученные дифференциальным центрифугированием.

Экспериментальные модели in vivo

Моделирование дефицита синтеза оксида азота (Экспериментальная группа 1, n=8, крысы-самцы Wistar) осуществляли внутрибрюшинным введением неселективного ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-N^o-нитроаргинина (L-NAME, «Sigma», США) в дозе 25мг/кг в течение 7 суток.

Моделирование изменения уровня синтеза оксида азота субстратом NO-синтазы (Экспериментальная группа 2, n=8, крысы-самцы Wistar) проводили внутрижелудочным введением раствора L-аргинина («Sigma», США) на 0,9 % растворе NaCl в дозе 500 мг/кг в течение 10 суток.

Изучение корригирующего действия L-аргинина при экспериментальном подавлении синтеза оксида азота (Экспериментальная группа 3, n=8, крысы-самцы Wistar) осуществляли внутрибрюшинным введением L-NAME 25 мг/кг с 3-и по 10-е сутки на фоне перорального введения L-аргинина (500 мг/кг).

Контрольные группы 1-3 (n=8 для каждой группы, крысы-самцы Wistar): осуществляли введение физиологического раствора, при этом вариант введения, объемы раствора и продолжительность воздействия совпадали с таковыми для соответствующей экспериментальной группы.

Моделирование выраженной гипергомоцистеинемии (Экспериментальная группа 4, n=8, крысы-самцы Wistar) проводили внутрижелудочным введением метионина в качестве субстрата для синтеза гомоцистеина в виде суспензии, приготовленной на 1% крахмальном растворе с добавлением 10% твина-80, в дозе 1,5 г/кг ежедневно 2 раза в сутки в течение 21 дня. Животным контрольной группы 4 (n=8, крысы-самцы Wistar) таким же образом внутрижелудочно вводилась суспензия, не содержащая метионин (состав по массе: 10% твина-80, 1% крахмала, 89% воды) в течение 21 дня.

Изучение эффектов L-аргинина на фоне выраженной гипергомоцистеинемии (Экспериментальная группа 5, n=8, крысы-самцы Wistar): выборке животных вводили L-аргинин («Sigma», США) per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением метионина по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения метионина). Животным контрольной группы 5 (n=8, крысы-самцы Wistar) осуществляли введение L-аргинина per os 1 раз в сутки в дозе 500 мг/кг на 0,9% растворе NaCl в течение 10 суток параллельно с введением суспензии,

не содержащей метионин, по схеме, описанной выше (с 12 по 21 сутки введения суспензии).

Экспериментальное моделирование острого венозного тромбоза (n=18, крысы-самки Wistar) осуществляли путём лигирования общей подвздошной вены одной конечности в специально оборудованной операционной вивария. Выведение животных из эксперимента осуществлялось на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции. В качестве контроля использовался материал, полученный от интактных животных, сопоставимых по возрасту, массе и условиям содержания с экспериментальными особями (n=6, крысы-самки Wistar).

Экспериментальные модели in vitro: суспензии клеток

Для моделирования окислительного стресса в условиях *in vitro* осуществляли инкубацию выделенных из периферической крови интактных животных (n=10, крысы-самки Wistar) моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитов в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 5 мМ перекись водорода в течение 18 часов при температуре 37⁰С. Контрольные группы формировались для каждого вида клеток инкубацией в аналогичных условиях без добавления перекиси водорода.

Для моделирования дефицита синтеза оксида азота *in vitro* производили инкубацию свежевыделенных тимоцитов и спленоцитов интактных животных (n=8, крысы-самцы Wistar) в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-Gln, по 2 мг/мл стрептомицина и пенициллина, с дополнительным внесением L-NAME («Sigma», США) в конечной концентрации 5 мМ в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

Для моделирования изменения уровня синтеза оксида азота (II) субстратом *in vitro* производили инкубацию свежевыделенных тимоцитов и спленоцитов интактных животных (n=8, крысы-самцы Wistar) в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-Gln, по 2 мг/мл стрептомицина и пенициллина, с дополнительным внесением L-аргинина («Sigma», США) в конечной концентрации 5 мМ в течение 24 часов при

температуре 37⁰С. Контрольные группы формировались из тимоцитов и спленоцитов, инкубированных в полной питательной среде в течение 24 часов при температуре 37⁰С.

Экспериментальные модели in vitro: суспензии лизосом

Моделирование окислительного стресса *in vitro* на суспензиях изолированных лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) осуществляли путем их инкубации в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 5мМ перекись водорода в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С.

Для оценки эффектов изолированного воздействия L-аргинина осуществляли инкубацию суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 5 мМ L-аргинин («Sigma», США) в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С

Для исследования протективных эффектов L-аргинина при окислительном стрессе осуществляли инкубацию суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 5мМ перекись водорода и 5 мМ L-аргинин («Sigma», США) в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С.

Изучение возможных эффектов оксида азота осуществляли путем инкубации суспензий лизосом печени интактных крыс (n=18, крысы-самки Wistar) в 0,25 М растворе сахарозы (среда выделения), содержащем 0,1 М нитропруссид натрия в течение 1, 2 и 4 часов при температуре 37⁰С.

Контрольные группы формировались инкубацией изолированных суспензий лизосом печени интактных крыс (n=6 для каждой экспериментальной группы, крысы-самки Wistar) в аналогичных условиях в среде выделения.

Методы исследования

Определение концентрации белка в исследуемом материале проводили по методу Лоури (коммерческий набор НПЦ «Эко-сервис», СПб); активность кислой

фосфатазы в образцах измеряли унифицированным методом по «конечной точке», основанном на количественном определении продукта ферментативного расщепления *n*-нитрофенилфосфата – *n*-нитрофенола (коммерческий набор «Витал Диагностикс», СПб); концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови экспериментальных животных соответствующих серий определяли методом иммуноферментного анализа коммерческим набором Axis® HomocysteineEIA («Axis-Shield Diagnostics Ltd», Великобритания). Содержание метаболитов оксида азота (суммарную концентрацию нитратов и нитритов) определяли спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса. Для количественной оценки содержания окислительно модифицированных белков в исследуемом материале использовали определение уровня карбонильных производных по R. L. Levine в модификации Е. Е. Дубининой; метод основан на реакции взаимодействия карбонильных производных окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, подлежащих спектрофотометрической регистрации. Регистрация продуктов и последующая обработка результатов проводилась в соответствии с разработанным в ходе исследования способом комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, основанном на анализе площади под кривой спектра поглощения ДНФГ-производных после регистрации на длинах волн 230, 254, 270, 280, 356, 363, 370, 428, 430, 434, 524, 530, 535 нм, выбранных в соответствии с диапазонами поглощений соответствующих динитрофенилгидразонов. Значения, полученные при измерении карбонильных производных, образовавшихся при спонтанном и металл-катализируемом окислении, использовали для расчета показателя резервно-адаптационного потенциала (РАП): значение РАП (%) является разницей между принятым за 100% результатом измерения карбонильных производных в металл-катализируемом варианте и процентной долей в нем значения показателя, полученного для спонтанного окисления. Активность лизосомальных цистеиновых протеиназ - катепсинов В, L и Н изучалась

спектрофлуориметрическим методом, основанном на количественном определении 7-амидо-4-метилкумарина, высвобождающегося в результате энзиматического гидролиза пептидной связи соответствующего субстрата: N α -CBZ-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина В, N α -CBZ-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина L, Arg-7-amido-4-methylcoumarin («Sigma», США) для катепсина Н. Аутокаталитическое действие катепсинов оценивалось по коэффициенту отношения значения активности фермента, полученного в реакции с применением 15-минутной преинкубации в отсутствии субстрата к параллельно определяемому значению активности без преинкубации (K_{ACA} – коэффициент аутокаталитического действия). Доля внелизосомальной активности (традиционно обозначаемая как коэффициент лабильности, $K_{лаб}$) для изучаемых катепсинов и кислой фосфатазы рассчитывалась как отношение активности соответствующего фермента в неседиментруемой фракции (НСА) к его общей активности (ОА, сумма активности в неседиментируемой и седиментируемой фракциях).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием программ «Microsoft Office Excel 2013» и «Statistica 10.0». Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для вариационных рядов с отсутствием согласия данных с нормальным распределением вычисляли характеристики: медиану (Me), верхний и нижний квартили (Q1 и Q3 соответственно), результаты представляли в формате Me [Q1;Q3]; использовались также минимальное (min) и максимальное (max) значение. При нормальном распределении данных вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (s), результаты представляли в формате $M \pm s$. Поскольку отмечалось отсутствие согласия большинства данных с нормальным распределением, для оценки статистической значимости различий независимых выборок преимущественно использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест), при нормальном распределении

использовали t-критерий Стьюдента. Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена.

Результаты исследования

Разработка способа комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях

Разработан новый подход к анализу результатов измерения содержания карбонильных производных: способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, защищенный патентом РФ. Сущность нового подхода заключается в том, что анализу подлежит площадь под кривой спектра поглощения ДНФГ-derivатов карбонильных производных белков. В качестве результата анализа используется общая площадь под кривой спектра поглощения (Собщ), характеризующая общее содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в материале, а также суммы площадей под кривой участков поглощения, характерных для альдегид-динитрофенилгидразонов ($S_{\text{АДНФГ сумм}}$) и кетон-динитрофенилгидразонов ($S_{\text{КДНФГ сумм}}$). Способ также дает возможность произвести расчет доли первичных (АДНФГ) и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса, как соотношение $S_{\text{АДНФГ сумм}}$ или $S_{\text{КДНФГ сумм}}$ к $S_{\text{Собщ}}$ (%); результаты измерения $S_{\text{Собщ}}$ в металл-катализируемом и спонтанном варианте используются для расчета значения РАП.

Изменения общей активности лизосомальных цистеиновых протеиназ в экспериментальных моделях, ассоциированных с окислительным стрессом

На данном этапе нами был получен положительный ответ на вопрос о наличии чувствительности цистеиновых катепсинов к окислительному стрессу.

Так, исследование общей активности катепсинов В, L, Н в фракционированных лейкоцитах крови после инкубации в среде,

содержащей 5 мМ H₂O₂, продемонстрировало наличие статистически значимых изменений изучаемых показателей (Таблица 1).

Таблица 1

Изменения активности катепсинов В, L, Н в лейкоцитах крови при *in vitro* моделированном окислительном стрессе, нмоль/чхмг белка (M±s)

	ПМЯЛ		МЯЛ	
	Контроль (инкубация в среде RPMI-1649)	Опыт (инкубация в среде RPMI-1649 с 5 мМ H ₂ O ₂)	Контроль (инкубация в среде RPMI-1649)	Опыт (инкубация в среде RPMI-1649 с 5 мМ H ₂ O ₂)
Катепсин В	1631,3±724,9	458,8±379,5*	642,5±593,0	1734,1±1318,6*
Катепсин L	1386,7±661,4	394,8±309,9*	418,4±317,6	1424,0±1083,3*
Катепсин Н	710,3±427,2	173,5±143,1*	157,1±119,8	529,0±432,6*

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)

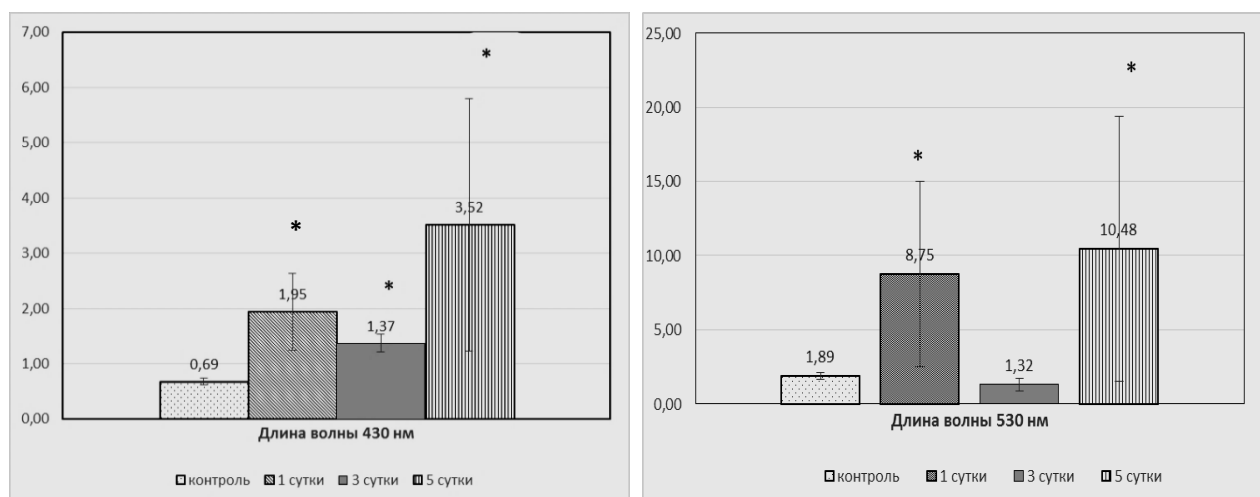
При экспериментальном венозном тромбозе обнаружено повышение активности цистеиновых катепсинов в моноядерных и полиморфноядерных лейкоцитах (Таблица 2) на фоне нарастания продуктов окислительной модификации белков в плазме крови (Рисунок 1).

Таблица 2

Изменение активности катепсинов В, L, Н лейкоцитов крови в динамике экспериментального венозного тромбоза, нмоль/чхмг белка (M±s)

	Контроль	Экспериментальный венозный тромбоз		
		1 сутки	3 сутки	5 сутки
Полиморфноядерные лейкоциты				
Катепсин В	0,84±0,19	14,61±4,36*	13,2±4,92*	12,54±2,94*
Катепсин L	17,15±4,47	29,27±5,87*	22,62±7,37	25,89±7,64
Катепсин Н	5,37±1,79	12,44±2,46*	10,96±4,59	11,08±5,05*
Моноядерные лейкоциты				
Катепсин В	1,26±0,24	16,14±5,05*	15,91±6,27*	8,38±3,00*
Катепсин L	22,91±5,66	27,95±7,41	23,44±5,24	19,53±8,60
Катепсин Н	1,40±0,29	12,31±3,67*	10,36±3,70*	5,74±2,36*

Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы (p<0,05)



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 1. Содержание продуктов окислительной модификации белков в плазме крови в динамике экспериментального венозного тромбоза (е.о.п./мг белка, $M \pm s$)

В стенке пораженной и интактной вены при экспериментальном венозном тромбозе (Рисунок 2), а также в тимоцитах и спленоцитах после инкубации с ингибитором синтеза NO (Рисунок 3) было обнаружено сочетание нарастания продуктов окислительной модификации белка и общей активности цистеиновых катепсинов.

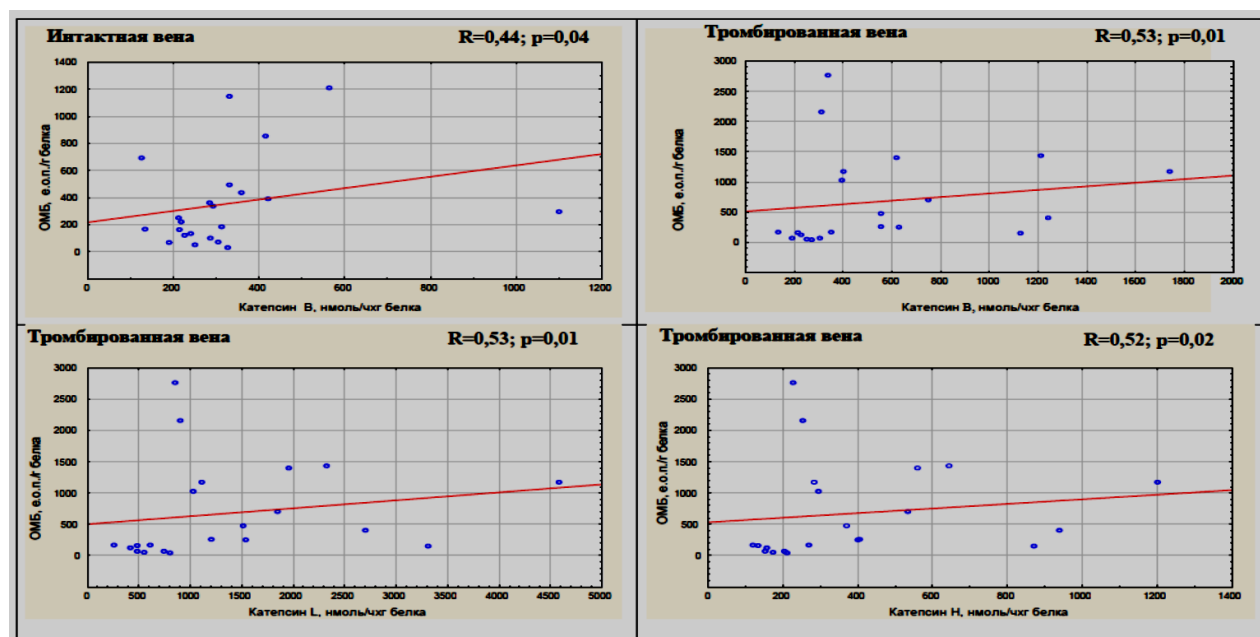
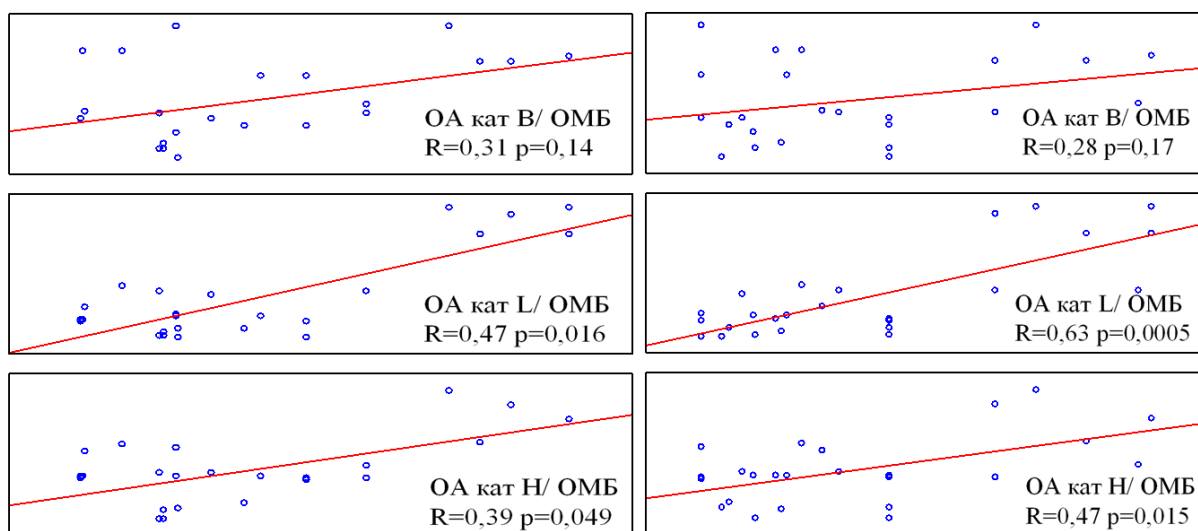


Рисунок 2. Зависимость активности цистеиновых катепсинов от содержания ОМБ в стенке тромбированной и интактной вены



Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от общего содержания ОМБ (S общ) в тимоцитах

Зависимость общей активности (ОА) катепсинов В, L, Н от общего содержания ОМБ (S общ) в спленоцитах

Рисунок 3. Зависимость активности цистеиновых катепсинов от содержания ОМБ в тимоцитах и спленоцитах *in vitro*

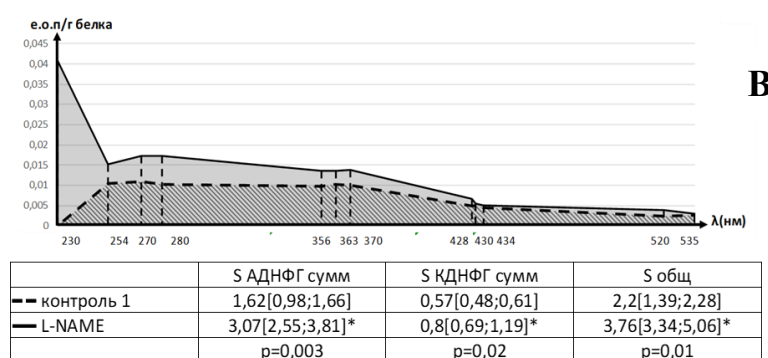
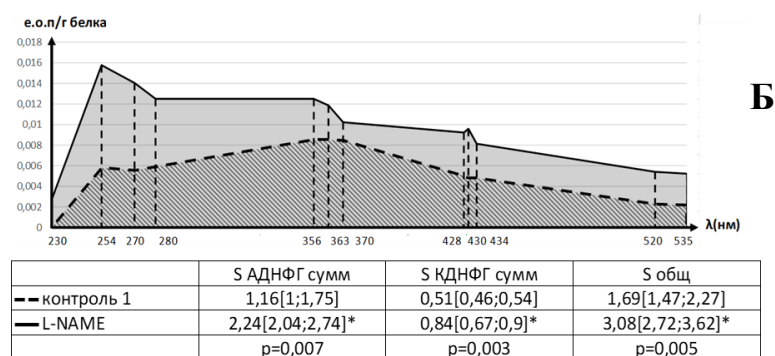
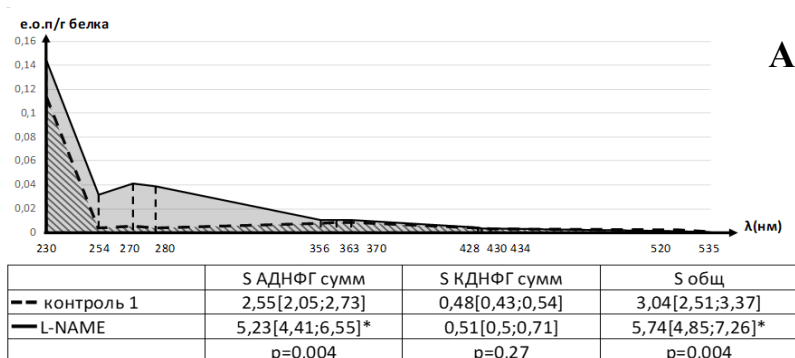
Дополнительно, обнаружена способность L-аргинина снижать содержание продуктов окислительной модификации белков при *in vitro*-воздействии на тимоциты: Sobщ 10,9[3,4;18,8] против 27,5[20,9;44,8] для контрольной группы, $p=0,03$.

Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальном изменении синтеза оксида азота in vivo

Обнаружено, что блокирование синтеза оксида азота вызывает нарастание продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции гомогенатов ткани печени, почки и легкого (Рисунок 4), в ткани печени изменения сопровождались снижением значения РАП (41,3[9,5;45,5] против 67,7[61,0;70,9], $p=0,004$); кроме того, выявлены статистически значимые обратные корреляционные связи между общим содержанием ОМБ и концентрацией метаболитов оксида азота в изучаемом материале (R от -0,36 до -0,51), что демонстрирует мало изученные к

настоящему моменту антиоксидантные эффекты оксида азота, как минимум в отношении белков.

Описанное повышение ОМБ сочеталось для печени и почки с изменениями активности цистеиновых катепсинов, однако эффекты оказались преимущественно подавляющими (Рисунок 5), а в ткани легкого изменений активности ЛЦП обнаружено не было.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 4. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени (А), почки (Б), легкого (В) при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза NO, Me [Q₁;Q₃]

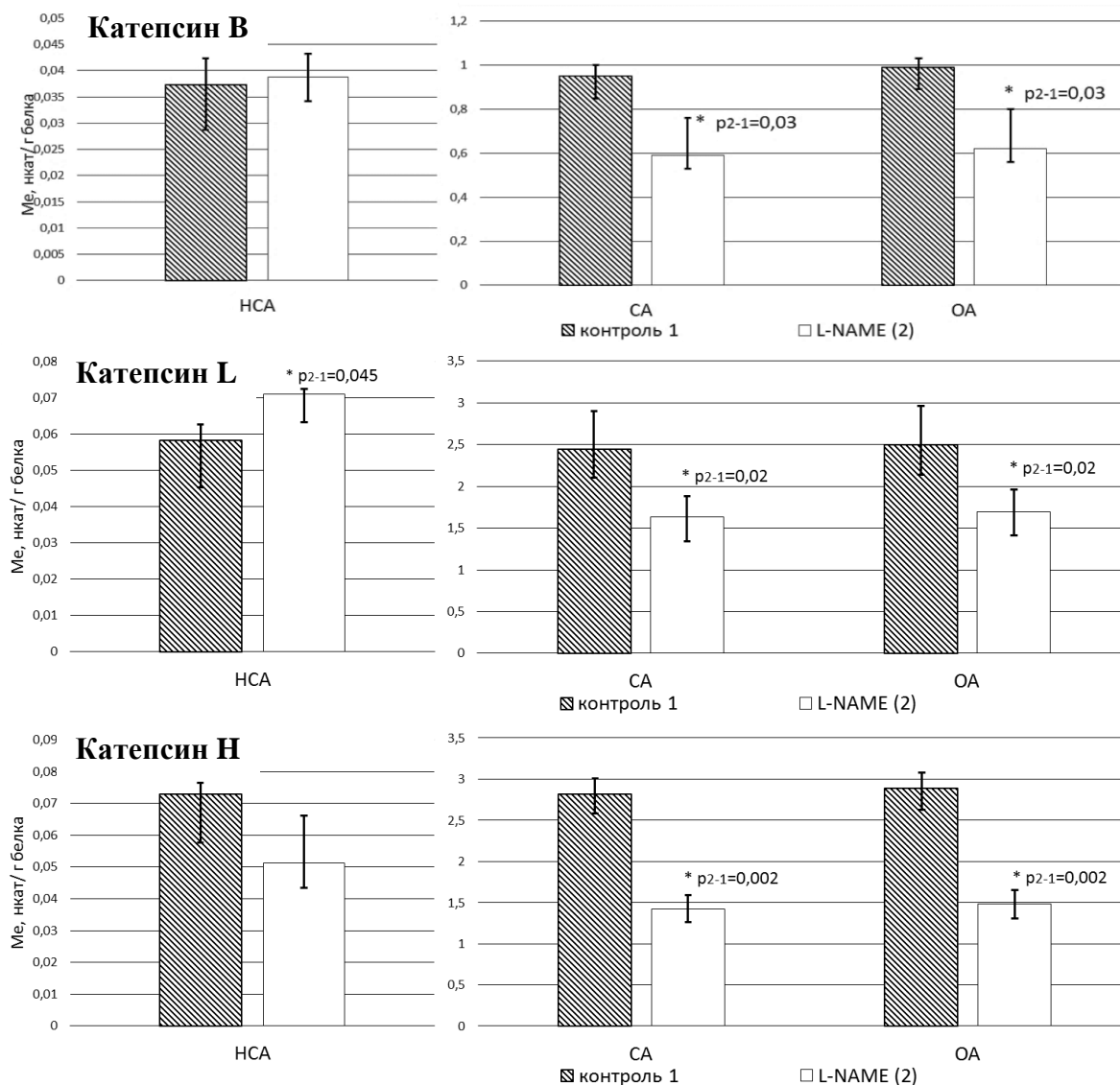
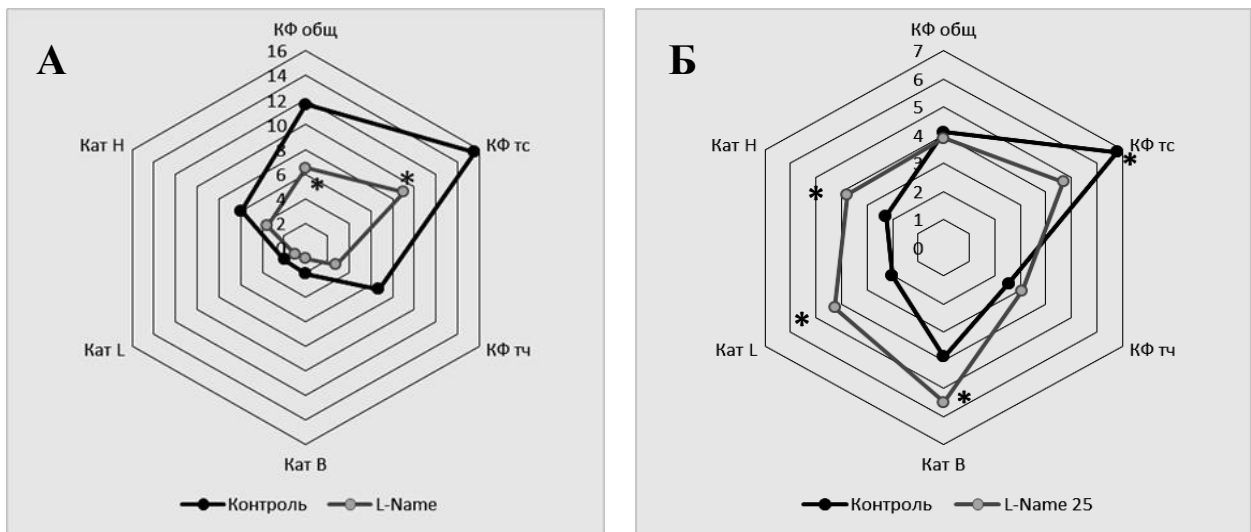


Рисунок 5. Изменение активности катепсинов В, L, Н в субклеточных фракциях ткани почки при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота

Снижение активности цистеиновых катепсинов на фоне нарастания ОМБ в данной модели сочеталось с повышением показателя K_{ACA} , что в этих условиях можно трактовать как замедление протеолитического процессинга, приводящее к снижению количества активных молекул ферментов.

При оценке состояния проницаемости лизосомальной мембраны обнаружено, что под действием ингибитора синтеза оксида азота происходит снижение общей проницаемости лизосомальной мембраны, для ткани почки — в сочетании с повышением доли внелизосомальной активности катепсинов

В, L, H (Рисунок 6). Это наблюдение позволило на данном этапе сформулировать предположение о наличии селективного выхода цистеиновых катепсинов в цитоплазму в данной модели.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 6. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани печени (А) и почки (Б) при *in vivo*-воздействии ингибитора синтеза оксида азота

Наличие взаимосвязи процессов окислительной модификации белков и изменений активности цистеиновых катепсинов в данной модели было подтверждено обнаружением многочисленных, преимущественно обратных, корреляций между изучаемыми признаками.

L-аргинин при изолированном воздействии *in vivo* вызывал снижение содержания ОМБ в ткани печени (1,05[0,98;1,08] против 3,65[3,00;4,15] для контрольной группы, $p=0,01$); этот эффект не сочетался с изменениями содержания метаболитов оксида азота и, следовательно, не может объясняться антиоксидантным действием NO. Кроме того, введение L-аргинина приводило к повышению внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов в изучаемых тканях (Рисунок 7), что может иметь значение для участия этих ферментов в утилизации поврежденных белков цитоплазмы, а также потенциально оказывать проапоптогенное действие.

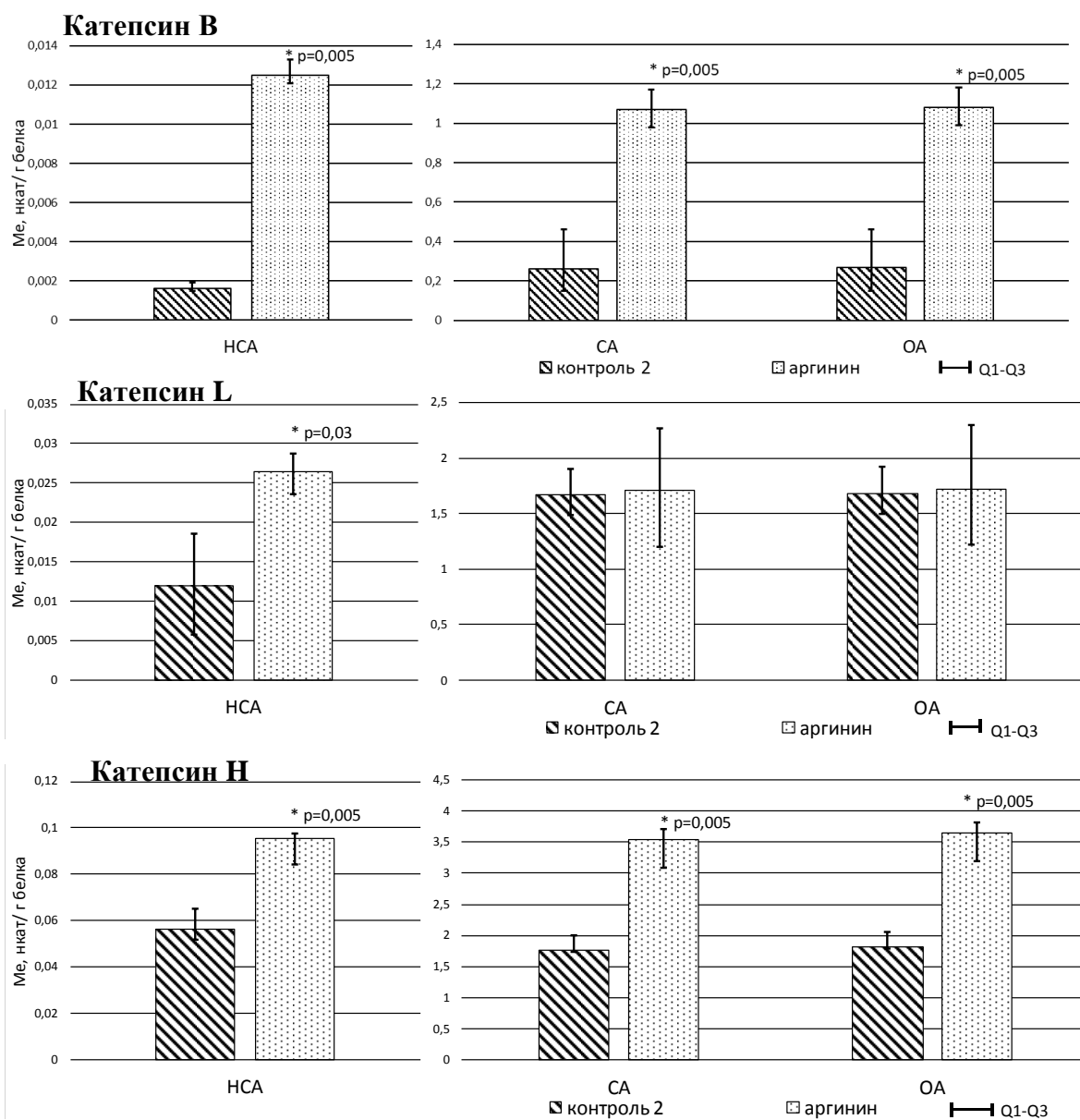


Рисунок 7. Изменение активности катепсинов В, L, H в субклеточных фракциях ткани легкого при *in vivo*-воздействии L-аргинина

Оценка корректирующего влияния L-аргинина на состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при экспериментальной гипергомоцистеинемии

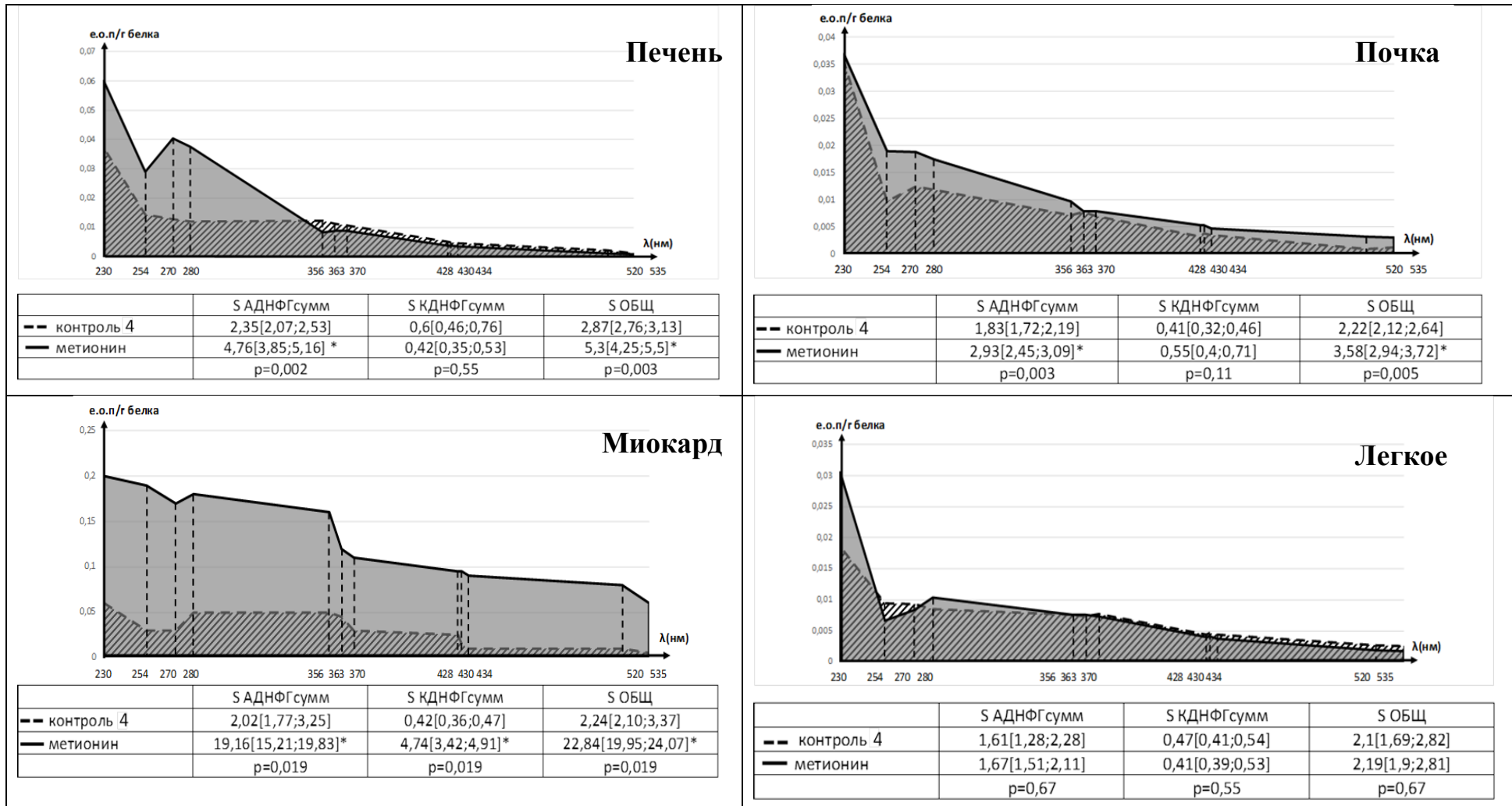
Описанное выше выявление положительных эффектов L-аргинина побудило к исследованию его потенциального корректирующего воздействия на изучаемые нами процессы при экспериментальной гипергомоцистеинемии, являющейся признанным фактором формирования окислительного стресса.

Было обнаружено, что экспериментальная гипергомоцистеинемия провоцирует нарастание продуктов окислительной модификации белков в ткани печени, почки, миокарде, но не в ткани легкого (Рисунок 8). При этом степень изменения в миокарде оказалась наиболее выраженной и положительно коррелировала с уровнем гипергомоцистеинемии ($R=0,76$; $p=0,0009$), что согласуется с представлениями о гипергомоцистеинемии как факторе риска кардиоваскулярной патологии и расширяет возможности понимания механизмов подобной связи.

Важным результатом мы считаем обнаружение разнонаправленных изменений активности ЛЦП в данной модели: умеренное повышение ОМБ в ткани печени и почки сочеталось, как и в модели с ингибированием синтеза оксида азота, со снижением внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов, в то время как выраженное нарастание ОМБ в миокарде оказалось ассоциированным с нарастанием активности ЛЦП в цитоплазматической фракции, что следует трактовать уже не как адаптивную реакцию, а скорее как проявление развивающегося повреждения органелл и клеток.

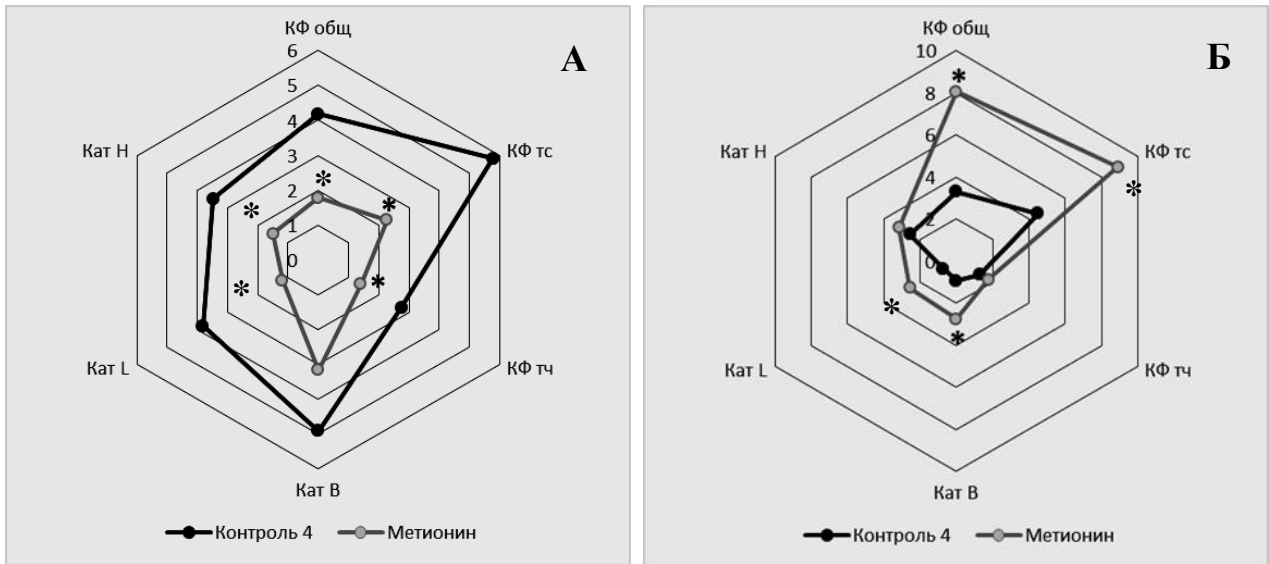
Кроме того, на этой модели получены также разнонаправленные изменения показателей проницаемости лизосомальной мембраны (Рисунок 9), позволившие сформулировать тезис о значимости степени выраженности окислительного стресса для направления изменения проницаемости лизосомальных мембран и подтвердить предположение о повреждении лизосом как причине нарастания внелизосомальной активности ЛЦП в миокарде.

Предположение о способности L-аргинина оказывать корректирующее действие на состояние окислительной модификации белков и изменения активности цистеиновых катепсинов в данной модели получило свое подтверждение: применение L-аргинина на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии практически полностью скорректировало уровень ОМБ в ткани печени и почки и частично – в миокарде.



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 8. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции тканей при экспериментальной гипергомоцистеинемии, Me [$Q_1; Q_3$]



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно контрольной группы ($p < 0,05$)

Рисунок 9. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани почки (А) и миокарда (Б) при экспериментальной гипергомоцистеинемии

Параллельно, L-аргинин в значительной степени корректировал выявленные на фоне изолированной гипергомоцистеинемии изменения активности цистеиновых катепсинов в изучаемых тканях, в большей степени за счет изменений компарментализации ферментов (Рисунок 10, 11).

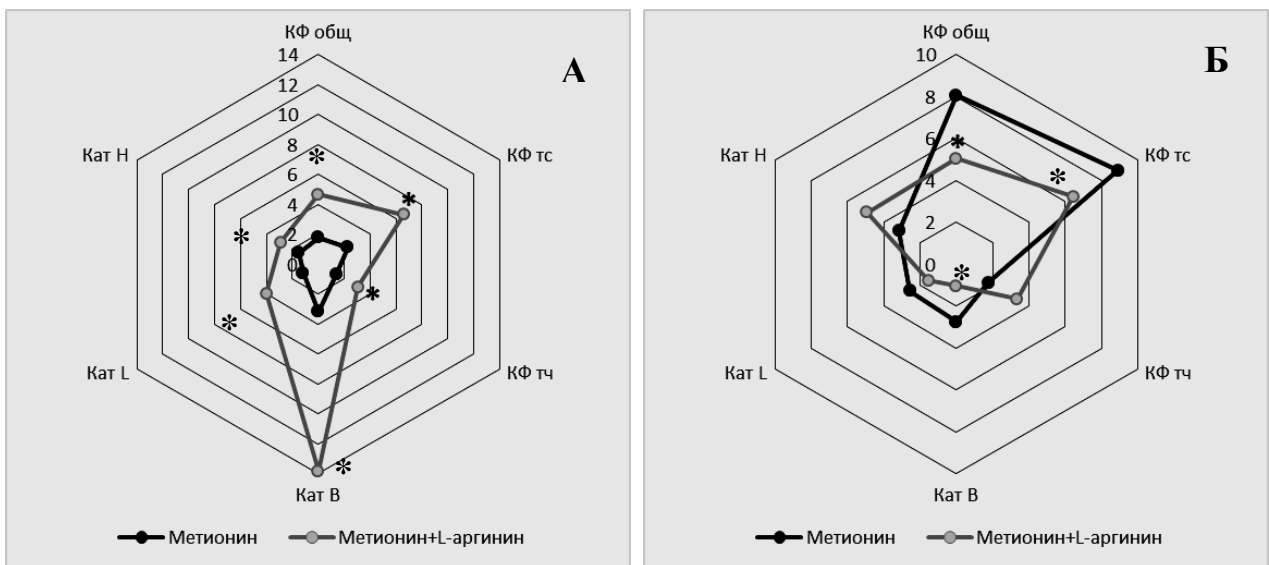
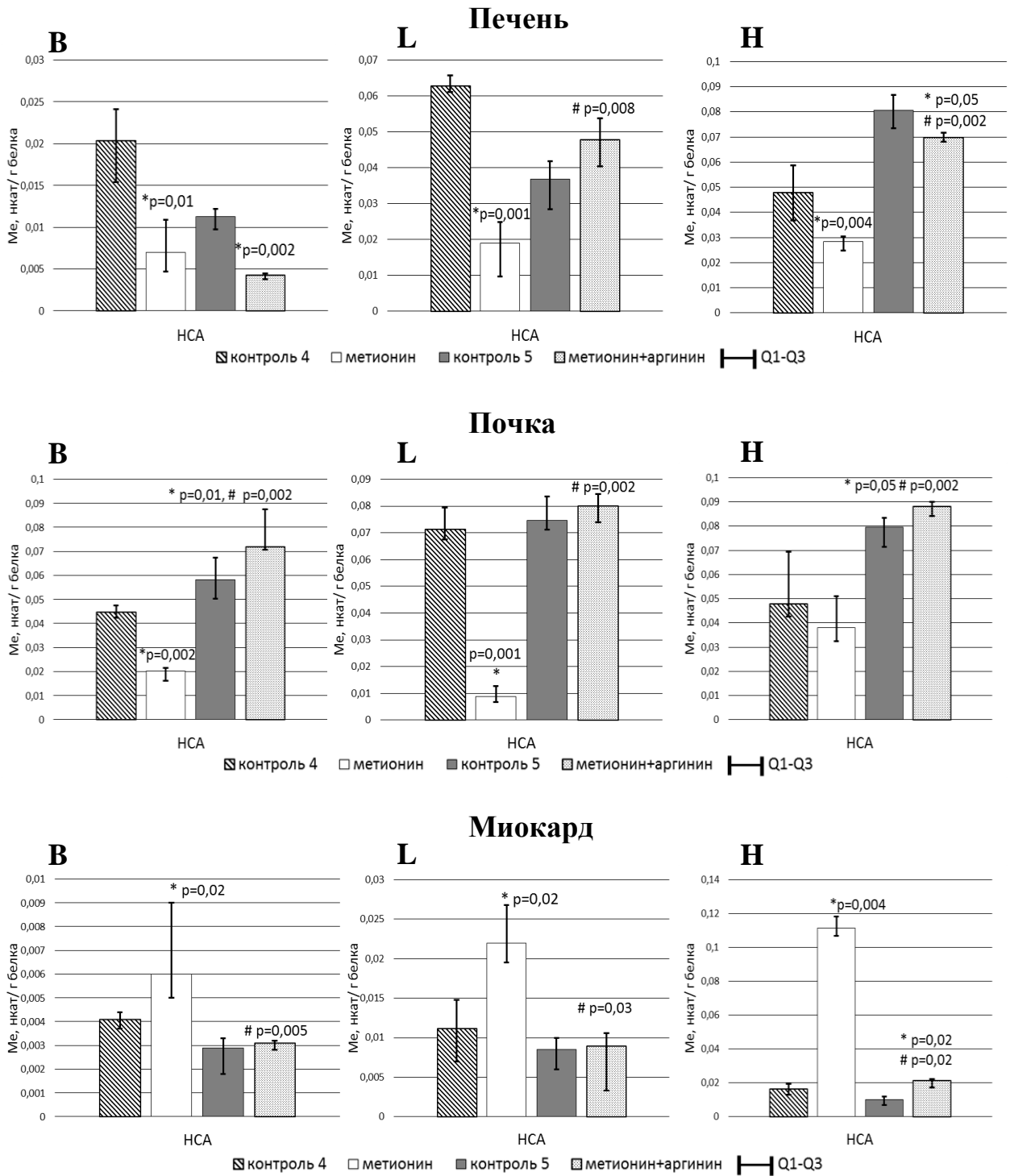


Рисунок 10. Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы ткани, почки (А) и миокарда (Б) при экспериментальной гипергомоцистеинемии



Примечание: * - изменения показателя статистически значимы относительно соответствующей контрольной группы ($p < 0,05$); # - изменения показателя статистически значимы относительно группы с изолированной гипергомоцистеинемией ($p < 0,05$)

Рисунок 11. Изменение активности катепсинов В, L, H в неседиментируемой фракции гомогенатов при экспериментальной гипергомоцистеинемии и действии L-аргинина

Дополнительным положительным эффектом L-аргинина оказалась его способность снижать выраженность гипергомоцистеинемии, что также может оказаться частью механизма развития его положительных эффектов.

Анализ корреляционных связей позволил не только дополнительно подтвердить наличие взаимозависимости изменений активности ЛЦП и проницаемости лизосомальной мембраны с состоянием окислительной модификации белков, но и продемонстрировать, что в качестве причины выявленных изменений следует в большей степени рассматривать окислительный стресс, чем прямое токсическое влияние гомоцистеина.

Состояние окислительной модификации белков и изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ изолированных лизосом при индукции окислительного стресса in vitro

Обнаружено, что 5 мМ пероксид водорода при *in vitro*- воздействии на лизосомы печени крыс индуцирует окислительную модификацию их белков, наиболее выраженную при 2 часовой инкубации (Рисунок 12), что сочеталось с нарастанием активности катепсинов В и L как в седиментируемой, так и в неседиментируемой фракции в сочетании с признаками снижения показателя проницаемости лизосомальной мембраны.

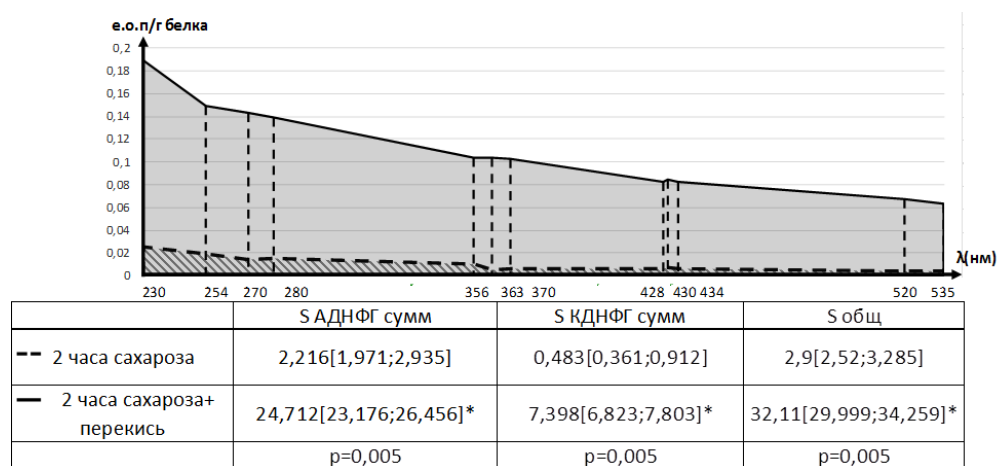


Рисунок 12. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе

Для L-аргинина подтверждена способность оказывать протективные эффекты в отношении окислительной модификации белков, проявляющиеся при 1-часовом воздействии, а также способность практически полностью корректировать вызываемое пероксидом водорода выраженное нарастание продуктов окислительного карбонилирования белков и частично – сочетающиеся с ним изменения активности ЛЦП при 2 часовой инкубации (Таблица 3); однако при этом обнаружено, что удлинение воздействия субстанции до 4 часов влечет за собой прооксидантные эффекты (Рисунок 13).

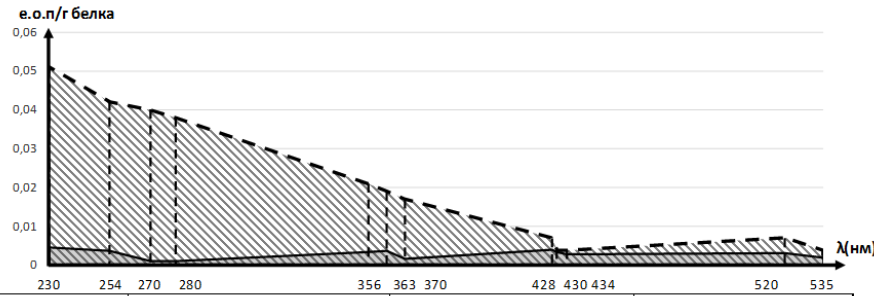
Таблица 3

Изменения активности и распределения катепсинов В, L, Н лизосом печени крыс при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе и действии L-аргинина при 2 часовой инкубации, нкат/г белка (Me[*min*;max])

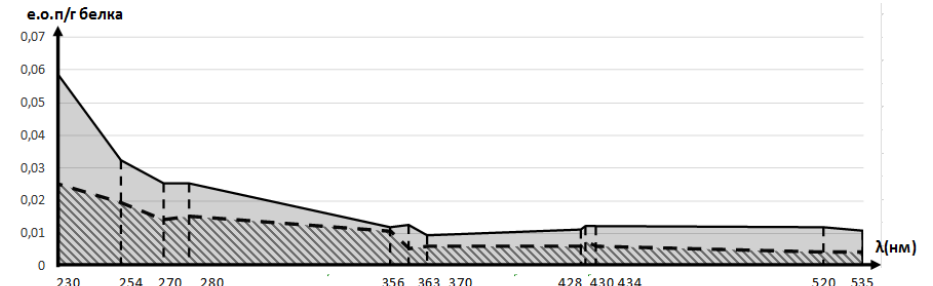
		Сахароза	Сахароза+ H ₂ O ₂	L-аргинин	L-аргинин+ H ₂ O ₂
Кат. В	ОА	0,44[0,26;0,91]	1,45[0,94;1,68]*	1,67[0,40;2,32]	1,26[0,71;2,30]
	СА	0,15[0,01;0,28]	0,58[0,45;0,79]*	1,62[0,25;2,32]	1,07[0,52;1,85]*
	НСА	0,12[0,00;0,50]	0,76[0,32;0,84]*	0,06[0,00;0,13]	0,18[0,17;0,19] ^{▲•}
Кат. L	ОА	0,74[0,40;0,96]	2,84[2,13;4,04]*	1,95[1,86;2,29]*	2,13[1,45;2,81]*
	СА	0,15[0,07;0,73]	1,71[1,15;1,94]*	1,86[1,31;2,15]*	1,84[1,45;2,23]*
	НСА	0,09[0,08;0,50]	1,57[0,76;2,01]*	0,15[0,13;0,53]	0,10[0,04;0,29] [▲]
Кат. Н	ОА	2,46[2,33;2,54]	1,42[1,11;1,70]*	0,59[0,48;0,73]*	2,53[1,81;2,54] [•]
	СА	0,95[0,92;0,99]	0,91[0,78;1,15]	0,18[0,00;0,35]*	1,91[1,51;2,27] ^{▲•}
	НСА	1,53[1,34;1,65]	0,56[0,36;0,79]*	0,37[0,29;0,46]*	0,35[0,30;0,35]*

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); [▲] - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; [•] - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина (p≤0,05)

Нитропруссид натрия при 4 часовом воздействии вызывал нарастание содержания окислительно модифицированных белков в лизосомах, что



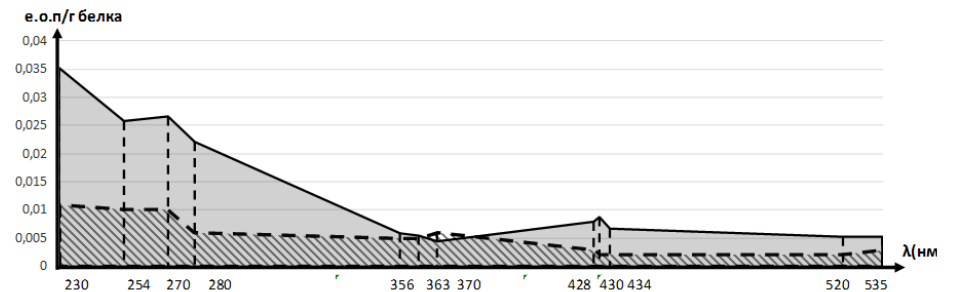
	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
-- 1 час сахароза	5,392[5,125;5,616]	0,89[0,629;1,135]	6,384[5,792;6,972]
— 1 час аргинин	0,372[0,088;0,478]*	0,101[0,019;0,133]*	0,546[0,007;0,574]*
	p=0,005	p=0,005	p=0,005



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
-- 2 часа сахароза	2,216[1,971;2,935]	0,483[0,361;0,912]	2,9[2,52;3,285]
— 2 часа аргинин	4,514[4,075;4,852]	0,945[0,518;1,284]	5,324[4,816;5,902]
	p=0,092	p=0,29	p=0,12

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно соответствующих контрольных наблюдений

Рисунок 13. Содержание продуктов окислительного карбонилирования белков в лизосомах печени крыс в динамике изолированного *in vitro*-воздействия L-аргинина



	S АДНФГ сумм	S КДНФГ сумм	S общ
-- 4 часа сахароза	1,341[1,222;1,415]	0,344[0,339;0,551]	1,753[1,651;1,808]
— 4 часа аргинин	6,635[2,747;8,638]*	0,473[0,399;0,754]	7,387[3,659;9,013]*
	p=0,008	p=0,12	p=0,008

сочеталось с подавлением активности цистеиновых катепсинов, а также признаками снижения проницаемости лизосомальной мембраны (Таблица 4).

Таблица 4

Показатели доли неседиментируемой активности (Клаб) цистеиновых катепсинов и кислой фосфатазы при *in vitro*- индуцированном окислительном стрессе, % (Ме [Q₁; Q₃])

Группа	1 час			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	39,1[9,3;85,2]	36,2[33,1;40,7]	37,4[26,0;37,5]	25,3[18,1;27,3]
Сахароза+ H ₂ O ₂	28,3[23,5;43,3]	31,5[19,1;50,1]	36,6[34,1;40,9]	19,7[18,7;23,9]
L-аргинин	38,1[27,9;86,2]	4,6[3,9;10,1]*	35,0[27,2;42,5]	38,0[35,3;43,3]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	30,6[17,9;84,5]	6,6[5,5;8,5]* [▲]	34,7[25,2;41,3]	36,9[34,2;40,6]* [▲]
Нитропруссид Na	39,0[34,3;41,9]	12,7[7,0;18,0]*	20,4[17,1;25,5]	16,6[14,1;19,5]
	2 часа			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	64,1[13,7;78,8]	42,9[14,7;82,2]	59,1[55,2;62,6]	27,1[26,4;28,8]
Сахароза+ H ₂ O ₂	45,4[35,9;62,3]	48,1[37,1;54,7]	33,7[29,1;39,2]*	17,4[15,5;20,9]*
L-аргинин	3,1[0,2;78,8]	14,1[6,3;34,2]	76,4[50,2;100,0]	20,1[14,0;25,4]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	19,5[15,3;26,1] [▲]	8,8[1,0;13,7] [▲]	16,8[10,1;24,6]* [▲]	15,5[13,0;26,8]*
Нитропруссид Na	20,9[2,8;32,3]	11,0[8,3;13,9]	21,7[10,9;30,0]*	11,5[11,2;18,3]*
	4 часа			
	Катепсин В	Катепсин L	Катепсин Н	К. фосфатаза
Сахароза	10,8[6,7;13,3]	16,9[11,6;20,6]	50,6[38,3;54,4]	27,6[24,1;30,2]
Сахароза+ H ₂ O ₂	4,8[4,6;12,8]	24,6[19,9;29,8]*	54,6[46,0;58,0]	23,5[23,2;25,4]
L-аргинин	23,6[21,3;100,0]*	0,0[0,0;5,5]*	39,6[35,6;43,9]	20,9[19,7;21,8]*
L-аргинин+H ₂ O ₂	34,2[22,8;85,5]* [▲]	40,2[9,9;91,4]	100,0[53,2;100,0]	39,4[33,8;40,5]* ^{▲•}
Нитропруссид Na	38,3[32,7;62,4]	16,5[8,7;23,2]	16,1[11,8;17,3]*	10,6[10,4;10,9]*

Примечание: * - изменения статистически значимы относительно инкубации в сахарозе (контрольные наблюдения); [▲] - изменения статистически значимы относительно инкубации с 5 мМ H₂O₂; [•] - изменения статистически значимы относительно изолированного действия L-аргинина (p≤0,05)

*Возможности оценки селективного изменения компартиментализации
активности лизосомальных цистеиновых протеиназ*

Описанные при проведении исследования рассогласования между значениями доли внелизосомальной активности лизосомальных цистеиновых протеиназ и кислой фосфатазы продиктовали необходимость в новом числовом показателе, который, учитывая общее состояние лизосомальной мембраны, давал бы возможность оценить степень избирательного изменения её проницаемости для лизосомальных цистеиновых протеиназ. Для решения данной задачи нами был предложен коэффициент селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ ($K_{СКА}$).

Предлагаемый способ оценки селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ основан на сочетанном измерении долей неседиментируемой активности ($K_{лаб}$) индивидуального катепсина (Cath) и кислой фосфатазы (AP). Значение соотношения

$$\frac{K_{лаб AP}}{K_{лаб Cath}}$$

в условиях равномерного выхода из лизосом кислой фосфатазы и изучаемого катепсина приближено к 1, поэтому для оценки селективного изменения компартиментализации активности катепсина целесообразно производить трактовку отклонения полученного значения от 1 в положительную или отрицательную сторону.

Методика расчета предлагаемого показателя. Коэффициент селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ ($K_{СКА}$) определяется формулой:

$$K_{ска} = 1 - \frac{K_{лаб AP}}{K_{лаб Cath}}$$

где:

$K_{лаб Cath}$ – доля неседиментируемой активности индивидуального катепсина;

$K_{лаб AP}$ – доля неседиментируемой активности кислой фосфатазы;

1— значение соотношения в условиях равномерного выхода из лизосомной фракции кислой фосфатазы и изучаемого катепсина, то есть при отсутствии селективного изменения компартиментализации активности последнего.

Трактовка изменений. Возможны три диапазона значения $K_{СКА}$:

$$1. K_{СКА} \sim 0, \text{ если } \frac{K_{\text{лаб AP}}}{K_{\text{лаб Cath}}} \sim 1, \text{ т.е. } K_{\text{лаб AP}} \sim K_{\text{лаб Cath}}$$

Данное условие выполняется при равномерном выходе во внелизосомальную фракцию конкретного катепсина и кислой фосфатазы, что, в зависимости от степени повышения показателей $K_{\text{лаб}}$, демонстрирует различную степень повреждения (лабилизации) лизосомальной мембраны.

$$2. K_{СКА} > 0, \text{ если } \frac{K_{\text{лаб AP}}}{K_{\text{лаб Cath}}} < 1, \text{ т.е. } K_{\text{лаб AP}} < K_{\text{лаб Cath}}$$

Данное условие выполняется при пермеабиллизации лизосомальной мембраны, проявляющейся в селективном изменении её проницаемости для индивидуального катепсина.

$$3. K_{СКА} < 0, \text{ если } \frac{K_{\text{лаб AP}}}{K_{\text{лаб Cath}}} > 1, \text{ т.е. } K_{\text{лаб AP}} > K_{\text{лаб Cath}}$$

Современный уровень знания о лизосомальных цистеиновых протеиназах позволяет предположить, что данное условие выполняется при воздействии факторов, снижающих активность изучаемого катепсина во внелизосомальной фракции. В этих случаях степень селективного изменения проницаемости лизосомальной мембраны оценить при помощи предлагаемого коэффициента невозможно, признаком степени повреждения мембраны является степень нарастания $K_{\text{лаб AP}}$.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволяющий дать количественную характеристику общего уровня продуктов окислительного карбонилирования протеинов и содержания их отдельных фракций, а также предоставляющий возможность определения доли первичных и вторичных маркеров

окислительного стресса и объективизирующий расчет показателя резервно-адаптационного потенциала (РАП).

2. Установлено увеличение общей активности цистеиновых катепсинов В, L, Н моноядерных (*in vivo* и *in vitro*) и полиморфноядерных лейкоцитов (*in vivo*), тимоцитов и спленоцитов (*in vitro*), стенки тромбированных и интактных вен (*in vivo*) в условиях окислительного стресса.
3. Применение неселективного ингибитора NO-синтазы L-N^o-нитро-аргинина метилового эфира (L-NAME) приводит к нарастанию общего содержания окислительно модифицированных белков в цитоплазматической фракции гомогенатов печени, почки, легкого, сопровождающемуся количественным нарастанием АДНФГ, сочетающимся для ткани печени и легкого с увеличением доли АДНФГ в общем пуле продуктов карбонилирования протеинов и, для ткани печени, снижением значения РАП.
4. L-аргинин при изолированном введении вызывает снижение содержания окислительно модифицированных белков в ткани печени без статистически значимых изменений концентрации метаболитов NO; в ткани почки применение L-аргинина вызывает подавление синтеза оксида азота, что сочетается с изменениями содержания окислительно модифицированных белков, однотипными с полученными при применении L-NAME.
5. При экспериментальной гипергомоцистеинемии выявлена интенсификация образования ОМБ в цитоплазматической фракции гомогенатов печени, почки и, в наибольшей степени, в миокарде, где повышение общего содержания окислительно карбонилированных белков положительно коррелировало с уровнем гипергомоцистеинемии и сопровождалось нарастанием не только первичных (АДНФГ), но и вторичных (КДНФГ) маркеров окислительного стресса. В ткани

легкого изменений содержания окислительно модифицированных белков на данной модели не выявлено.

6. Ингибирование синтеза оксида азота оказывает преимущественно подавляющие эффекты на активность катепсинов В, L, Н в ткани печени, почки и легкого, что сопровождается признаками повышения доли проферментных форм и снижения общей проницаемости лизосомальной мембраны.
7. L-аргинин вызывает повышение внелизосомальной активности катепсина L в ткани печени, катепсинов В, L, Н в ткани легкого (для катепсинов В и Н – в сочетании с нарастанием лизосомальной активности), а также лизосомальной активности катепсина Н в ткани почки.
8. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается снижением внелизосомальной активности цистеиновых катепсинов в ткани печени и почки, при этом цитоплазматическая активность катепсинов В, L, Н в миокарде возрастает. Направленность изменений активности сочетается с направленностью изменений проницаемости лизосомальной мембраны: умеренное повышение содержания окислительно модифицированных белков ассоциировано для ткани почки с показателями, свидетельствующими о снижении проницаемости лизосомальной мембраны; обнаруженное для миокарда значительное повышение содержания окислительно модифицированных белков – с признаками лабильности лизосомальной мембраны.
9. При *in vitro*-индукции окислительного стресса прямым воздействием на суспензию лизосом H_2O_2 максимальные изменения содержания окислительно модифицированных белков выявлены после 2 часов инкубации, что сопровождалось нарастанием активности катепсинов В и L как в седиментируемой, так и в неседиментируемой фракции в сочетании с показателями, свидетельствующими о снижении

проницаемости лизосомальной мембраны. Донор NO нитропруссид натрия после 4 часов инкубации вызывал увеличение содержания окислительно модифицированных белков в лизосомах, что сочеталось с подавлением лизосомальной активности изучаемых ферментов.

10. Установлено, что L-аргинин на моделях *in vitro*- и *in vivo*- проявлял способность существенно корректировать вызванные индукторами окислительного стресса повышение содержания окислительно модифицированных белков и изменения активности/ компартиментализации цистеиновых катепсинов. Обнаружена способность данной аминокислоты вызывать выход цистеиновых катепсинов в цитоплазму и способствовать их протеолитическому процессингу.

11. Зависимость изменений активности/ компартиментализации цистеиновых катепсинов, а также показателей проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительной модификации белков при окислительном стрессе подтверждается выявленными множественными статистически значимыми корреляционными связями между изучаемыми признаками.

12. Предложен коэффициент селективной компартиментализации активности ($K_{СКА}$), позволяющий при сочетанной оценке с показателем доли внелизосомальной активности для конкретной лизосомальной протеиназы количественно оценить проницаемость лизосомальной мембраны для индивидуального фермента.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В исследованиях, использующих измерение содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в качестве маркера окислительного стресса, рекомендуется для повышения научной информативности и объективизации результатов использовать разработанный способ комплексной оценки содержания продуктов

окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.

2. Обнаруженная обратная зависимость содержания окислительно поврежденных белков от концентрации метаболитов оксида азота для ткани печени, почки, легкого свидетельствует об антиоксидантных свойствах NO в отношении протеинов этих тканей, что рекомендуется учитывать при разработке и применении препаратов, действие которых основанных на антиоксидантных эффектах NO.
3. Выявленные зависимости изменений активности и внутриклеточного распределения цистеиновых катепсинов от выраженности процесса окислительной модификации белков рекомендуется учитывать при планировании исследований, связанных с изучением вклада данной группы ферментов в патологические и адаптивные процессы, так и при разработке и тестировании препаратов, использующих цистеиновые катепсины в качестве мишеней.
4. При дальнейшем изучении процесса пермеабиллизации лизосомальных мембран рекомендуется использовать полученные сведения о его зависимости от выраженности окислительного стресса; также рекомендуется проведение исследований, связанных с изучением окислительной модификации белков мембран лизосом в качестве фактора изменения их прижизненной проницаемости.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Проверка гипотезы о вовлеченности цистеиновых катепсинов в утилизацию поврежденных белков требует проведения *in vitro*-исследований с использованием очищенных ферментов и различных белковых субстратов, что одновременно внесет вклад в развитие исследований в области дифференциального карбонилирования белков и их чувствительности к протеолизу.
2. Обнаружение нарушения соотношения проферментных и активных форм цистеиновых катепсинов при окислительном стрессе может

дополнить представления о механизмах протеолитического процессинга при условии *in vitro*- подтверждения замедления расщепления проэнзимов при действии окислителей.

3. Обнаружение способности L-аргинина снижать содержание окислительно модифицированных белков и влиять на активность цистеиновых катепсинов и проницаемость лизосомальной мембраны может иметь важное значение для биологии и медицины, но дальнейшее изучение механизмов этих феноменов требует целого комплекса как *in vivo*-, так и *in vitro*- исследований.
4. Обнаруженное снижение проницаемости лизосомальных мембран при умеренной выраженности окислительного стресса требует дальнейшей проверки гипотезы об этапности пермеабиллизации в зависимости от степени окислительного повреждения белков мембран лизосом.
5. Продемонстрированные в исследовании рассогласования между показателями доли внелизосомальной активности маркерного фермента лизосом кислой фосфатазы и цистеиновых катепсинов стали основанием для предложенного нами коэффициента селективной компартментализации активности катепсинов, который следует использовать в дальнейших исследованиях с целью выявления феномена пермеабиллизации лизосомальных мембран.
6. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований механизмов развития процессов, ассоциированных с окислительным стрессом и/или изменениями активности цистеиновых катепсинов, а также для разработки и тестирования новых препаратов с потенциальным антиоксидантным, про- и антиапоптогенным действием.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях,
рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки
России для публикации основных научных результатов диссертаций
Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих
в международные реферативные базы данных и системы цитирования**

1. Фомина Н.В. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ лейкоцитов при *in vitro* моделированном оксидативном стрессе [Текст] / Н.В. Фомина, **М.А. Фомина**, Ю.В. Абаленихина // **Цитокины и воспаление.** – 2012. – Т. 11, №3. – С. 156-158.
2. Абаленихина Ю.В. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II) [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // **Казанский медицинский журнал.** – 2014. – Т. 95, №4. – С. 553-557.
3. Окислительное карбонилирование белков стенки сосудов в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Ангиология и сосудистая хирургия.** – 2015. – №1. – С. 29-34. – (Соавт.: **М.А. Фомина**, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков).
4. Ильичева А.С. Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L и H и проницаемость лизосомальной мембраны в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина** // **Казанский медицинский журнал.** – 2015. – Т. 96, №5. – С. 819-824.
5. **Фомина М.А.** Влияние L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в эксперименте и при стимуляции оксидативного стресса *in vitro* [Текст] / **М.А. Фомина**, А.М. Кудлаева // **Казанский медицинский журнал.** – 2015. – Т. 96, №5. – С. 876-882.
6. Влияние L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира и нитропруссиды натрия *in vitro* на окислительную модификацию белков лизосом печени крыс [Текст] / **М.А. Фомина** [и др.] // **Казанский медицинский журнал.** – 2017. – Т. 98, №6. – С. 1005-1011. – (Соавт.: А.М.Кудлаева, С.А.Исаков, А.Н. Рябков).
7. *In vitro*-эффекты нитропруссиды натрия и L-N^ω-нитроаргинина метилового эфира на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость мембраны лизосом [Текст] / **М.А. Фомина** [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2018. – №1. – С. 43-46. – (Соавт.: А.М.Кудлаева, С.А.Исаков, В.В.Давыдов).

**Работы, опубликованные в других рецензируемых научных изданиях
Перечня ВАК Минобрнауки России**

8. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови в динамике экспериментального тромбоза у крыс / Н.В. Фомина [и др.] // **Фундаментальные исследования.** – 2013. – №2-

- 1.– С. 197-200. – (Соавт.: **М.А. Фомина**, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков).
9. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ стенки сосудов в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина [и др.] // **Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.**– 2013.– Т. 8, №1.– С. 73-76. – (Соавт.: **М.А. Фомина**, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков).
- 10.Ильичева А.С. Оценка активности катепсинов L, Н и степени их секреции в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина** // **Фундаментальные исследования.**– 2014.– №10-9.– С. 1725-1728.
- 11.Медведев Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, **М.А. Фомина** // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.**– 2014.– №4.– С. 42-46.
- 12.Ильичева А.С. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина** // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.** – 2015.– №1.– С. 45-51.
- 13.Кудлаева А.М. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс [Текст] / А.М. Кудлаева, **М.А. Фомина**, С.А. Исаков // **Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науке о Земле.**– 2017.– Т. 27, №3.– С. 368-374.
- 14.**Фомина М.А.** Влияние аргинина на активность и компартиментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов при оксидативном стрессе на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] /**М.А. Фомина**, А.А. Терентьев // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.**– 2018.– №2.– С. 195-212.
- 15.Способ оценки селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ [Текст] /**М.А. Фомина** [и др.] // **Наука молодых (Eruditio Juvenium).**– 2018.– Т.6, №2.– С. 277-284. – (Соавт.: Ю.В. Абаленихина, А.М. Кудлаева, А.А. Терентьев).
- 16.**Фомина М.А.** Изменения субклеточного распределения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота [Текст] /**М.А. Фомина**, А.А. Терентьев // **Исследования и практика в медицине.**– 2018.– №3.– С. 28-39.

**Статьи, опубликованные в рецензируемых изданиях, не входящих в
Перечень ВАК Минобрнауки России**

17. Абаленихина Ю.В. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на активность и аутопроцессинг катепсина В иммуно-компетентных органов крыс в условиях *in vitro* [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2014.– №1.– С. 53-59.
18. Ильичева А.С. Характеристика продуктов окислительного повреждения белков миокарда на фоне гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина**, Д.В. Медведев // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2014.– №4.– С. 37-43.
19. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности [Текст] / С.А. Теплов [и др.] // Наука молодых (Eruditio Juvenium).– 2016.– №1.– С. 50-54. – (Соавт.: Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина**, И.В. Матвеева).
20. **Fomina M.A.** Cathepsins B, L and H splenocytes as the secondary antioxidant systems in the conditions of carbonyl stress [Text] / **M.A. Fomina**, Y.V. Abalenikhina // Advances in Biochemistry).– 2015.– Vol.3, №1.– С. 5-8.

Тезисы в сборниках и материалах научных конференций

21. Активность катепсина L спленоцитов крыс в условиях *in vitro*-модулирования синтеза оксида азота [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. научных трудов по материалам IX Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем здравоохранения»: Астрахань, 2013. – С. 77-78.
22. Влияние N-нитро-L-аргининметилового эфира на активность и аутопроцессинг катепсина L крыс *in vivo* и *in vitro* [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. научных трудов по материалам XII региональной научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (дни лабораторной диагностики южного федерального округа)»: Ростов-на-Дону, 2013. – С. 3-7.
23. Влияние N-нитро-L-аргининметилового эфира на спектр окислительной модификации белков и жизнеспособность спленоцитов *in vitro* [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. научных статей V Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке»: Казань, 2013. – С. 727-732.
24. Влияние модуляторов синтеза оксида азота на окислительную модификацию белков спленоцитов крыс // Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. трудов международного симпозиума «Биохимия – основа наук о жизни», посвященного 150-летию образования кафедры биохимии Казанского университета: Казань, 2013. – С. 24-25.

25. Изменение активности катепсинов L и H в сердечной мышце крыс в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина**, В.И. Звягина // В сб. статей Международной научно-практической конференции «Медицинские науки: прошлое, настоящее и будущее»: Научный центр «Аэтерна», 2014. – С. 3-7.
26. Изучение спонтанной окислительной модификации белков в тромбированной вене крыс в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина, **М.А. Фомина** // В сб. материалов Межрегиональной научной конференции с международным участием Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова: Рязань, 2014. – С. 15-18.
27. Резервно-адаптационный потенциал иммунокомпетентных тканей при L-NAME-индуцируемом окислительном стрессе [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. материалов 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии»: Пицунда (Абхазия), 2014. – С. 7.
28. Окислительная модификация белков миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина**, Д.В. Медведев // В сб. материалов 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии»: Пицунда (Абхазия), 2014. – С. 21.
29. Оценка окислительного карбонилирования белков при экспериментальном венозном тромбозе [Текст] / Н.В. Фомина, **М.А. Фомина** // В сб. материалов 10-й юбилейной Международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии»: Пицунда (Абхазия), 2014. – С. 42.
30. Изучение *in vitro*-воздействия L-аргинина на лизосомальный цистеиновый протеолиз изолированно и на фоне оксидативного стресса [Текст] / А.М. Кудлаева, **М.А. Фомина** // В сб. материалов XIV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при патологии и адаптации. Дни молекулярной медицины на Дону»: Ростов-на-Дону, 2015. – С. 51-55.
31. Изучение *in vitro*-воздействия L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ изолированно и при стимуляции оксидативного стресса [Текст] / А.М. Кудлаева, **М.А. Фомина** // Материалы Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста»: Рязань, 2015. – С. 146.
32. Взаимосвязь окислительной модификации белка и протеолиза [Текст] / Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина**, С.А. Исаков // В сб. материалов Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова, посвященной 65-летию работы университета на Рязанской земле: Рязань, 2015. – С. 251-253.

33. Окислительное карбонилирование белков лизосомальной и цитоплазматической фракции ткани почек при экспериментальном изменении синтеза оксида азота [Текст] / **М.А. Фомина**, Ю.В. Абаленихина, И.В. Матвеева // В сб. материалов Международной конференции «Новые инновационные технологии в медицине, биологии, фармакологии, экологии»: Весенняя сессия. Под ред. Е.Л. Глориозова: Гурзуф, 2015.– С. 94-100.
34. Влияние L-NAME на окислительную модификацию белков печени и почек крыс [Текст] / С.А. Теплов, Ю.В. Абаленихина, **М.А. Фомина** // В сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева»: Рязань, 2016.– С. 21-24.
35. Изменение активности лизосомального цистеинового протеолиза миокарда крыс при тяжелой форме гомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, **М.А. Фомина** // В сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева»: Рязань, 2016.– С. 34-38.
36. Оценка резервно-адаптационного потенциала сосудистой стенки интактной вены при экспериментальном венозном тромбозе [Текст] / Н.В. Короткова, **М.А. Фомина**, И.В. Матвеева // В сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика Е.А. Строева»: Рязань, 2016.– С. 165-169.

Публикации Роспатента – Патенты на изобретения

37. **Фомина М.А.**, Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Патент РФ на изобретение №2524667. 27.07.2014. Бюл. № 21, 9 с. Доступно по: http://www1.fips.ru/Archive/PAT/2014FULL/2014.07.27/INDEX_RU.HTM

Методические рекомендации

38. **Фомина М.А.**, Абаленихина Ю.В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [Текст] / Методические рекомендации для научных работников, аспирантов и преподавателей вузов медицинского и биологического профилей: Рязань, 2014. – 60 с.

Монографии

39. **Фомина, М.А.** Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 192 с.